

博士論文審査報告書

論文題目

Interfacial Design of Field Effect Transistor
Biosensor for Protein Determination
タンパク質定量検出用電界効果トランジスタ
バイオセンサの界面設計

申請者

秀島	翔
Sho	HIDESHIMA

応用化学専攻 応用電気化学研究

2011 年 2 月

予防医療分野での診断技術の開発は、大きな産業化への役割を担うのみならず、今後の高齢化社会での大きな役割を担っている。バイオセンサをこの分野で応用することは、潜在的疾病や無自覚疾病の早期発見・早期治療を実現し、人間の QOL (Quality of Life: 生活の質) の向上に大きく貢献する。特に、臨床応用を考えたバイオセンサが有すべき特性は、高信頼性、簡便性、迅速性、廉価、安全性が重要である。この分野では、現在、蛍光物質や発光物質等の標識分子を用いた生体分子の検出が一般的である。しかし上記の標識分子を用いた検出法は、検出対象物質に標識分子を結合させる必要性があり、バイオセンサに求められる簡便性や迅速性、さらには、コスト面で優れたバイオセンサの出現が望まれている。これらの問題点を解決する手法として、半導体チップを改良して大量の安価な検査チップを供給する可能性が考えられて、検出対象物質が有する電荷を直接検出する手法として、電界効果トランジスタ (Field Effect Transistor: FET) バイオセンサは、その可能性を持つチップとして検討されている。FET バイオセンサはゲート表面に吸着する検出対象物質の電荷を検出することで目的物の存在を判断するバイオセンサで、簡便かつ迅速な診断を行うことができる。また、半導体微細加工技術を用いたセンサの集積化・高密度化が可能である。FET バイオセンサによる臨床診断の実現は、疾患発見時間を短縮し、延いては疾患の根治に繋がると考えられる。FET バイオセンサは 1970 年代に提唱され、その実用化のための検討が広く行われてきたが、未だ実用化に至っていない。FET バイオセンサの実用化における課題を解決し、新たなバイオセンサの産業化へのトリガーとなる研究開発が望まれるところである。

このような現状において、本論文では、FET をバイオセンサに用いるための課題を整理し、バイオセンサの分子認識界面に着目して上記の課題を解決すべく、その界面の設計手法の可能性について新たな分野開拓を行っている。本論文は全 5 章から構成されている。

第 1 章では、バイオセンサ開発の現状について紹介し、FET バイオセンサの特長と課題について述べている。

第 2 章では、FET バイオセンサの課題のうち、狭い検出可能領域に関する課題の解決を試みている。FET の電荷変化の検出領域はゲート界面のごく近傍に制限されることが知られており、抗原・抗体のような分子サイズが大きいタンパク質を検出対象物質とした場合、その FET 応答能は低下する。この原因は、溶液 / ゲート界面の電気二重層の厚さ (デバイ長) が関係している。生理学的塩濃度溶液中におけるデバイ長は約 1 nm であるため、界面に受容体として固定化された大きさ約 10 nm であるタンパク質 (抗体) と検出対象物質 (抗原) はデバイ長の外で結合することとなる。その結果、検出対象物質が有する電荷は対イオンによって遮蔽され、FET による検出が困難となる。検出感度を確保するために、緩衝溶液を希釈してデバイ長を拡張する試みがなされてきた。しかし、希釈緩衝溶液下では生体分子の構造は不安定で、生

体分子間反応の反応効率が低下する。FETを用いたタンパク質検出においては、十分な検出感度を確保できる、できるだけ高いイオン強度の緩衝液を用いることが望まれる。2.1節では、タンパク質検出におけるFET応答量とタンパク質が有する電荷数の関係について検討し、同関係を利用した緩衝液濃度の理論的最適化手法の確立を試みた結果をまとめている。ビオチン修飾表面に対するアビジン吸着をモデル系として、アビジンの吸着に伴うFET応答量がデバイ長内に存在するアビジンの電荷数に由来することを、X線構造解析データに掲載されたアビジン分子の電荷分布情報を利用することで、実証している。本手法は、タンパク質分子を構成するアミノ酸が有する電荷の分布情報を用いることで、検出感度を確保できる緩衝液のイオン強度を実験せずに設定可能となることを意味する。本手法を導入することで、これまで試行錯誤的なアプローチが中心であった緩衝液濃度の最適化法の簡略化が期待され、その意味で、FETバイオセンサ評価に関する有益な成果である。

FETバイオセンサの検出感度を確保する方法として上記の他に、分子サイズの小さい受容体を用いる試みがある。抗体の抗原認識部位やアプタマーを受容体としてFET検出部に固定化する報告がなされている。しかし、抗体の抗原認識部位を作製するには、化学処理のプロセスやコストが必要になり、またアプタマーは、合成手法が未完成であるため検出対象に限られるという問題を有する。2.2節では、分子サイズが2 nm程度である糖鎖を利用した生理学的塩溶液下におけるタンパク質検出をまとめている。作製した糖鎖修飾FETに対してタンパク質（レクチン）を添加したところ、生理学的塩濃度溶液下において吸着に伴うFET応答を確認している。上記の環境下での検出は、糖鎖分子が小さくかつフレキシブルであることに起因し、その結果デバイ長範囲内でより大きな電荷密度が誘起されたためであると考察している。本手法をモデルとして、今後機能解析が進む糖鎖のFETへの応用が進み、FETの医療分野での実用化の一步になると期待される。本章は、測定溶液のイオン強度の最適化手法の提案や糖鎖修飾FETバイオセンサの開発を通じて、FETバイオセンサの課題である「狭い検出可能領域」の解決法を示したもので、新たな分野を拓くものとして高く評価できる。

第3章では、腫瘍マーカーを検出する安定した抗体固定化FETの提案を行っている。FETは検出界面の電荷密度変化を鋭敏に検知する反面、その高感度応答は、計測時の目的反応以外に伴う変化も検知し、再現性の低下を招いている。高感度かつ高い再現性を有するFETバイオセンサの界面設計の指針として、受容体を検出部に強固に固定化することが重要であることを本論文では見出し、抗体固定化に用いられる架橋剤グルタルアルデヒド（GA）を用いた安定な固定化法を見出している。すなわち、GAを修飾した表面に電圧を掃引して、形成されたシッフ塩基を完全に還元させ抗体をゲート部分に固定化する新しい手法を提案している。この結果、抗体の強固な固定化が可能になり、FET測定手順に簡便に電圧掃引を組み込み、応答安定性が向上した

FET を提供できることを明らかにしている．そして，肝臓がんの腫瘍マーカーとして知られる α フェトプロテイン（AFP）の検出にこの方法を適用し，カットオフ値と同等レベル 10 ng/ml の検出を達成，かつ，夾雑物存在下における AFP 検出も可能であることを明らかにしている．要するに，FET ゲート表面に強固な抗体固定化法の新たな提案を行い，FET バイオセンサの「低い再現性」という課題解決をしたことは高く評価できる．新たに再現よく腫瘍マーカーの FET 検出が可能となることを明らかにしたことは，単に，FET デバイス開発という点だけでなく，今後開発される同様な腫瘍マーカー検出用バイオセンサのバイオニオ的な研究と位置付けることが出来る．

第 4 章では，第 3 章で新たに開発したデバイスの新たな界面評価法の一つとして，液滴形状の銀ナノ構造体を用いたラマン散乱分光法による有機分子層構造解析の新たな手法を提案している．有機分子層の構造や組成の情報を得る手法として，表面増強ラマン散乱（Surface Enhanced Raman Scattering: SERS）が近年広く用いられているが，SERS 活性を利用して，液滴形状の銀ナノ構造体を有機分子層の上に作製して，その直下有機層の構造解析を行う手法を見出している．すなわち，液滴形状の銀ナノ構造体を測定対象である有機分子層表面に蒸着法にて作製し，ナノ構造体が液滴形状を有することで，ナノ構造体と分子層表面の接触領域にプラズモンを集め，これまで解析が困難であった有機分子層内の分子構造解析を可能となることを見出している．このことは，単に，FET バイオセンサ分野の有益な成果だけでなく，今後広く有機薄膜を利用する有機デバイスの面解析に役立つ大きな成果と高く評価できる．

第 5 章では，第 2 章から第 4 章で得られた実験結果を総括している．

以上，本論文は FET をベースにしたタンパク質定量が可能なバイオセンサを開発し，次世代バイオセンサの開発指針をまとめている．従って，本論文は工学的なバイオセンサ FET の開発のみならず，バイオセンシングの基礎的知見と学問体系を新たに開いて，今後のバイオセンサ分野に大きく貢献するものである．よって，本論文は博士（工学）学位論文として価値あるものと認める．

2011 年 2 月

審査員（主査）	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	逢坂 哲彌
	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	黒田 一幸
	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	菅原 義之
	早稲田大学教授	博士（工学）早稲田大学	本間 敬之
	早稲田大学准教授	博士（工学）早稲田大学	門間 聰之
学外審査員	Rome 大学教授 Ph.D (Univ. Rome)	Bruno Scrosati	
	Tel Aviv 大学教授 Ph.D (Technion)	Yosi Shacham-Diamand	